Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 2, Summer 2023, p. 453-465

The Effect of Mycorrhizal Fungus (*Piriformospora indica*) on the Morphological, Physiological and Biochemical Traits of the Medicinal Plant Stevia (*Stevia rebaudiana*) under Drought Stress

E. Nabizadeh[1]*, M. Haghshenas[2], K. Ahmadi[3]

Received: 20-05-2022 Revised: 30-07-2022 Accepted: 01-09-2022 Available Online: 01-09-2022	**How to cite this article:** Nabizadeh, E., Haghshenas, M., & Ahmadi, K. (2023). The effect of mycorrhizal fungus (*Piriformospora indica*) on the morphological, physiological and biochemical traits of the medicinal plant Stevia (*Stevia rebaudiana*) under drought stress. *Journal of Horticultural Science*, *37*(2), 453-465. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2022.75337.1173

Introduction

Stevia (*Stevia rebaudiana*) is one of the medicinal plants of the Asteraceae family that contains natural compounds, especially stevioside and ribaodioside A, which are estimated to be 150 to 400 times sweeter than sucrose. Plants are exposed to various environmental stresses during growth and development under natural and agricultural conditions. Among these, drought is one the most severe environmental stresses affecting plant productivity. About 80–95% of the fresh biomass of the plant body is comprised of water, which plays a vital role in various physiological processes including many aspects of plant growth, development, and metabolism. Stevia is susceptible to various environmental stresses but the major effects are contributed by drought. Today, the fungal species *Stevia rebaudiana* is used as a biofertilizer and increases the production of secondary metabolites of economically valuable plants and also increases the growth and seed production of many plants. This fungal endophyte produces a significant amount of acid phosphatase for mobility in a wide range of insoluble or complex forms of phosphate, enabling the host plant to have adequate access to inactive phosphorus reserves in the soil. However, medicinal plants that are cultivated have often been reported to have lower abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere, which significantly reduces plant survival. Considering the coexistence role of mycorrhizal fungi in modulating the effects of drought stress, the aim of this study was to investigate the morphological, physiological and biochemical traits of stevia in response to the effects of mycorrhizal inoculation and drought stress.

Materials and Methods

This experiment was conducted to investigate the effect of *P. indica* endophytic fungus under water stress conditions on vegetative characteristics, physiological parameters and micronutrients of stevia. A factorial experiment was employed based a completely randomized design with four replications in the research greenhouse of Islamic Azad University, Mahabad Branch in 2017. The first factor was drought stress at four levels (25, 45, 60 and 80% of field capacity) and the second factor was inoculation of seedlings with fungus at two levels (no inoculation and inoculation with *P. indica*). Water stress was applied based on a combination of plant appearance symptoms (no wilting to severe wilting) and soil moisture. Investigated traits included root colonization, dry weight, leaf number, plant height, stem diameter, chlorophyll a, b, total chlorophyll, carotenoids, proline, soluble sugars, antioxidant power and micronutrients including copper, iron, zinc and manganese. To analyze the data variance, SAS 9.1 statistical software was used to analyze the variance of the

1- Associate Professor, Department of Agrothechnology, Faculty of Agricultural, Islamic Azad University, Mahabad Branch, Mahabad, Iran
(*- Corresponding Author Email: nabizadeh.esmaeil@gmail.com)
2- Ph.D. Student in Horticulture, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
3- Ph.D. Student in Crop Physiology, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
DOI: 10.22067/jhs.2022.75337.1173

data.

Results and Discussion

The results showed that the evaluated traits in the present study were affected by the main treatments of fungus and drought stress. Seedlings inoculated with *P. indica* endophytic fungi had the highest percentage of root colonization, growth parameters, photosynthetic pigment content, soluble compounds and micronutrients compared to no inoculation. Drought stress increased soluble sugars, proline content and antioxidant power of stevia leaves and decreased the other traits by increasing the stress level from 25 to 80%. The highest rate of root colonization (26.90%), stem diameter (3.21 mm) and carotenoid content (1.71 µg/ml) was observed in the treatment of plant inoculation with fungi and 25% drought stress. While the highest antioxidant power was found in the treatment of plant inoculation with fungi and 80% drought stress. According to the results of the present study, use of *P. indica* fungus had the most positive effect on the quantitative and qualitative characteristics of stevia medicinal plant compared to no fungus inoculation.

Conclusion

This study showed the positive effect of *P. indica* endophyte inoculation on quantitative and qualitative characteristics of root colonization, dry weight, number of leaves, plant height, stem diameter, chlorophyll a, b, total chlorophyll, carotenoids, proline, soluble sugars, antioxidant power and The micronutrients of calcium, iron, zinc and manganese showed stevia, and drought stress reduced the studied traits except for proline content, soluble sugars and antioxidant power. Inoculation of stevia seedlings with *P. indica* endophytic fungi at drought stress levels had the highest rate of root colonization, stem diameter, carotenoid content and antioxidant power compared to non-fungal inoculation. Therefore, due to the effect of biological compounds of natural origin and the production of plants with healthier active secondary compounds, the use of *P. indica* endophytic fungi can be recommended.

Keywords: Stevia, Pigment, Nutrients, Photosystem, Water deficit

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۲، ص. ٤٦٥-٤٥۳

بررسی اثر قارچ میکوریزا (*Piriformospora indica*) بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana*) تحت تنش خشکی

اسمعیل نبی‌زاده[۱*] - مسعود حق‌شناس[۲] - خدیجه احمدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۳۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۰

چکیده

گیاه دارویی استویا از خانواده Asteraceae، حاوی ترکیبات طبیعی، به ویژه استویوزید و ریبائودیوزید A است که تخمین زده می‌شود ۱۵۰ تا ۴۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز باشد. به‌منظور بررسی اثر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* در شرایط تنش آبی بر خصوصیات رویشی، پارامترهای فیزیولوژیکی و عناصر ریزمغذی گیاه دارویی استویا، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار در سال ۹۷-۱۳۹۶ اجرا شد. عامل اول تنش خشکی در چهار سطح (۲۵، ۴۵، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت مزرعه) و عامل دوم تلقیح نشاء با قارچ در دو سطح (عدم تلقیح و تلقیح با *P. indica*) بودند. صفات مورد مطالعه شامل کولونیزاسیون ریشه، وزن خشک، تعداد برگ، ارتفاع بوته، قطر ساقه، کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پرولین، قندهای محلول، قدرت آنتی‌اکسیدانی و عناصر ریزمغذی شامل مس، آهن، روی و منگنز بودند. نتایج نشان داد که صفات مورد ارزیابی در پژوهش حاضر تحت تأثیر تیمارهای اصلی قارچ و تنش خشکی قرار گرفتند. نهال‌هایی که با قارچ اندوفیت *P. indica* تلقیح شده دارای بیش‌ترین درصد کولونیزاسیون ریشه، پارامترهای رشد، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات محلول و عناصر ریزمغذی نسبت به عدم تلقیح بودند. تنش خشکی موجب افزایش قندهای محلول، میزان پرولین و قدرت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه دارویی استویا شد و با افزایش تنش خشکی از ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به ۲۵ درصد باعث کاهش مابقی صفات شد. طبق نتایج مقایسه میانگین اثر برهمکنش قارچ در تنش خشکی، بیش‌ترین میزان کولونیزاسیون ریشه، قطر ساقه و محتوای کاروتنوئید در تلقیح گیاه با قارچ *P. indica* و تنش ۲۵ درصد و قدرت آنتی‌اکسیدانی در تنش ۸۰ درصد مشاهده شد. باتوجه به نتایج تحقیق حاضر استفاده از قارچ *P. indica* بیش‌ترین تأثیر مثبت بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی استویا نسبت به عدم تلقیح قارچ برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، استویا، عناصر غذایی، کم آبی، کلونیزاسیون

۱- دانشیار گروه آگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مهاباد، مهاباد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: nabizadeh.esmaeil@gmail.com)
۲- دانشجوی دکتری تخصصی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، ایران

DOI: 10.22067/jhs.2022.75337.1173

مقدمه

گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bert) از خانواده کاسنی (Asteraceae)، یک گونه علفی چند ساله و روز کوتاه است (Ucar *et al*., 2016). به‌طور طبیعی، این گیاه بین ۲۲-۲۴ درجه جنوبی و ۵۳-۵۶ درجه غربی در آمریکای جنوبی (پاراگوئه و برزیل) رشد می‌کند، و به آن گیاه شیرین می‌گویند (Lemus Mondaca *et al*., 2012). استویا به دلیل ترکیبات شیرین بدون کالری آن به‌طور گسترده‌ای کشت می‌شود. شیرینی گیاه استویا به وجود دی‌ترپن گلیکوزیدهای نوع انت-کورن (استویوزید و ریبائودیوزیدها) مربوط می‌شود که می‌تواند ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز باشد (Hajihashemi and Ehsanpour, 2014). گیاهان در طول رشد و نمو تحت شرایط طبیعی و کشاورزی در معرض تنش‌های محیطی مختلف قرار می‌گیرند. در این میان، خشکی یکی از شدیدترین تنش‌های محیطی است که بر تولید گیاه تأثیر می‌گذارد. حدود ۸۰ تا ۹۵ درصد از زیست توده تازه اندام گیاه از آب تشکیل شده است که نقش حیاتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله رشد، نمو و متابولیسم گیاه دارد (Brodersen *et al*., 2019). در نتیجه، برخی خشکسالی را به عنوان تنش محیطی اصلی برای گیاهان مختلف، به ویژه در مناطق مستعد خشکسالی (Diatta *et al*., 2020)، بحرانی ترین تهدید برای امنیت غذایی جهان در آینده و عامل قحطی‌های مهم در گذشته می‌دانند (Okorie *et al*., 2019). اثرات خشکسالی در کشاورزی به دلیل کاهش منابع آب و افزایش تقاضای غذا برای رشد نگران کننده جمعیت جهان تشدید می‌شود (O'Connell, 2017). ماهیت غیرقابل پیش بینی خشکسالی به عوامل مختلفی مانند توزیع نامناسب و غیریکنواخت بارندگی، تبخیر و تعرق و ظرفیت نگهداری آب در اطراف ریزوسفر بستگی دارد (Devincentis, 2020).

قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار در خاک با اکثر گیاهان خشکی‌زی همزیستی ایجاد می‌کنند (Meng *et al*., 2020). هیف‌های بالای میکوریزاهای آربوسکولار در سطح خارجی ریشه می‌تواند به مناطق دیگر گسترش یابد، در غیر این صورت برای ریشه ها جهت جذب آب و مواد مغذی غیرقابل دسترس و تأمین آنها برای میزبان برای تسریع در دستیابی منابع غذایی مهم توسط میزبان و افزایش تحمل تنش خشکی در گیاهان می‌شوند (Cheng *et al*., Wu *et al*., 2020; 2021). قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار میزان عملکرد، رشد و تجمع فعال گیاه در بیشتر گیاهان دارویی از جمله سنبل ختایی (*Angelica dahurica*)، آتراکتیلودس (*Atractylodes lancea*)، لاله باغی (*Tulipa gesneriana*)، جنسینگ (*Panax notoginseng*) و علف هفت بند (*Polygonum cuspidatum*) تحت تأثیر قرار می‌دهند (Gao *et al*., 2007; Ma *et al*., 2005; Tebuqin *et al*., 2015). مطالعات نشان داد که قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار بر فرآیندهای متابولیک ثانویه گیاهان، از جمله فلاونوئیدها و ترپنوئیدها تأثیر می‌گذارند. بیشتر ترپنوئیدها و آلکالوئیدها مواد اولیه فعال گیاهان دارویی هستند و دارای اثرات ضد التهابی، ضد باکتریایی، قلبی و ضد سرطانی هستند (Zhang *et al*., 2015). امروزه گونه قارچی *P. indica* به عنوان کود زیستی به کار می‌رود و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان با ارزش اقتصادی را افزایش داده و هم‌چنین سبب افزایش رشد و تولید بذر بسیاری از گیاهان می‌شود (Varma *et al*., 2012). این اندوفیت قارچی، مقدار قابل توجهی اسید فسفاتاز برای تحرک طیف گسترده‌ای از اشکال غیر قابل حل یا پیچیده فسفات تولید می‌کند و گیاه میزبان را قادر می‌سازد تا دسترسی کافی به ذخایر فسفر کم‌تحرک در خاک داشته باشد (Singh *et al*., 2000). با این حال، گیاهان دارویی که به‌صورت همزیستی با قارچ‌های میکورزا کشت می‌شوند، اغلب گزارش شده که میزان فراوانی کمتری از قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار در ریزوسفر دارند و که باعث کاهش قابل توجهی در بقای گیاه می‌شوند (Zhang *et al*., 2014). کاربرد قارچ میکوریزا (*P. indica*) سبب تعدیل اثرات منفی تنش خشکی می‌شود، و کاربرد کودهای زیستی از طریق افزایش رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش مقاومت گیاه چای ترش به تنش خشکی گردید (Sanayei *et al*., 2021). همزیستی گیاه دارویی ماریتیغال با قارچ‌های میکوریزا سبب افزایش در ویژگی های رشد و عملکرد شد (Hamzei and Salimi, 2015). بستر کشت ورمی کمپوست و تلقیح با قارچ میکوریزا در تیمارهایی که با محلول غذایی نوولا تغذیه شده بودند، باعث افزایش عملکرد برگ و برخی خصوصیات مربوط به ریشه گیاه دارویی استویا شد (Seyedmohammadi *et al*., 2017). با توجه به نقش همزیستی قارچ‌های میکوریزا در تعدیل اثرات تنش خشکی، هدف از این پژوهش بررسی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی استویا در پاسخ به اثرات تلقیح قارچ میکوریزا و تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها

مراحل آزمایش و شرایط رشد

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی شامل تیمار قارچ میکوریزا (بدون تلقیح قارچ و تلقیح قارچ *Piriformospora indica* با تعداد اسپورها 5×10^6 عدد در هر میلی‌لیتر مایه تلقیح) و تنش خشکی شامل چهار سطح (۲۵، ۴۵، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت مزرعه) در چهار تکرار انجام گرفت. این آزمایش در

سال ۱۳۹۶ به‌صورت گلخانه‌ای در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد انجام شد، دمای روز و شب به ترتیب ۲۵ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد، با دو سطح رطوبت نسبی ۶۰ (طی روز) و ۴۰ (طی شب) درصد و مقدار دی‌اکسید کربن حدود ۵۰۰–۶۰۰ میلی‌مول بر مول بود. بذور استویا از شرکت پاکان بذر اصفهان با درجه خلوص ۹۹ درصد و قوه نامیه ۸۰ درصد تهیه شدند. برای این مطالعه گیاهچه‌های یکسان برای کشت در گلدان‌های حاوی خاک مزرعه انتخاب شدند. گلدان‌هایی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر تا زیر لبه گلدان با خاک پر شدند. خاک مورد استفاده بافت رسی- لومی بود و در هر گلدان سه نهال کشت شد. در دو هفته اول کشت، تمام گلدان‌ها به‌طور یکسان آبیاری شدند. برای اندازه‌گیری درصد رطوبت خاک از دستگاه TDR (مدل TRYME، شرکت IMCO، ساخت آلمان) استفاده شد. برای کشت قارچ *P. indica* از محیط کشت پیچیده (Complex medium) حاوی عناصر میکرو، ماکرو، نمک‌ها، پپتون و عصاره مخمر استفاده شد، با تهیه تعداد کافی پتری‌دیش محتوای محیط کشت پیچیده، قارچ *P. indica* کشت و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور به مدت ۱۸ روز جهت تکثیر و تولید کافی اسپور نگهداری شد. پس از اتمام این مدت، اسپورهای قارچی با استفاده از محلول آب-توئین (۰/۰۲ درصد) و با کمک پاروی پلاستیکی جمع‌آوری شدند و پس از انجام مراحل سانتریفیوژ و انحلال طی سه مرتبه، تعداد آن‌ها با استفاده از لام نئوبار در حدود ۵×۱۰^{۶} تنظیم شد (Hill and Käfer 2001). پس از مرحله اول کم آبی، تیمار با قارچ نیز اعمال شد و پس از دور چهارم تنش آبی، نمونه‌های گیاه استویا برداشت شد.

آماده‌سازی خاک

یک نمونه ترکیبی از خاک لومی شنی (از لایه ۰ تا ۲۵ سانتی متر) از افق سطحی مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد جمع‌آوری شد و سپس از نظر فیزیکی و شیمیایی مشخص شد که حاوی ۶۸ درصد ماسه، ۲۰ درصد سیلت، ۱۲ درصد رس، ۱/۲ درصد ماده آلی، ۰/۰۵ درصد نیتروژن کل، ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم فسفر قابل دسترس، ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پتاسیم موجود، ۰/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم کل، دارای pH= ۷/۳ و با EC= ۱/۳ دسی‌زیمنس بر متر بود. خاک در هوای آزاد خشک شد، با الک ۲ میلی‌متری الک شد و در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت (۳ بار در ۳ روز متوالی) به‌منظور از بین بردن افزایش قارچ‌های بومی میکوریزا آربوسکولار و سایر میکروارگانیسم‌ها، استریل شد.

کلونیزاسیون ریشه و اندازه‌گیری قطر ساقه، ارتفاع ساقه و تعداد برگ: رنگ آمیزی ریشه برای تعیین کلونیزاسیون قارچ میکوریزا با استفاده از روش (Phillips and Hayman, 1970) انجام شد. ریشه گیاهان نمونه‌برداری شده به مدت ۵ دقیقه در محلول پتاسیم هیدروکسید (KOH) ۱۰ درصد با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سه بار زیر آب جاری به مدت ۱۰ دقیقه شسته شد. نمونه‌های ریشه با هیدروکلراید یک درصد به مدت یک دقیقه اسیدی شدند و سپس در محلول رنگ آمیزی تریپان بلو ۲۰ درصد غوطه‌ور شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. از نمونه‌های رنگ آمیزی شده، ۳۰ قطعه ریشه (طول ۱ سانتی‌متر) در هر بوته بریده شد و با میکروسکوپ نوری (Olympus BH-2 ×۲۰) مشاهده شد. کلونیزاسیون ریشه با توجه به روش تقاطع خط شبکه توصیف شده تعیین شد (Giovannetti and Mosse, 1980). در این روش، درصد کلونیزاسیون ریشه در هر گیاه با تقسیم تعداد کل قطعات ریشه کلونیزه شده (اعم از آربوسکول، وزیکول یا هیف) بر تعداد کل قطعات ریشه بررسی شده تعیین شد. پس از گذشت ۶۰ روز از کاشت، نمونه برداری از اندام‌هوایی بوته‌های استویا در سطح خاک برداشت شدند و ریشه‌ها به دقت از بستر خاک جدا شدند. اندام هوایی و ریشه‌ها با آب مقطر شسته شدند، با دستمال کاغذی پاک شدند و وزن شدند. شاخساره و ریشه جدا شدند، سپس ارتفاع بوته و تعداد برگ گیاه تعیین شد و در نهایت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند تا وزن خشک و غلظت عناصر ریزمغذی تعیین شود. برخی از قطعات ریشه در اتانول ۵۰ درصد قرار داده شد تا کلونیزاسیون ریشه مشخص شود.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید: اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئید طبق رابطه‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ انجام شد (Costache *et al*., 2012). به این ترتیب که ۰/۲ گرم بافت تازه برگ را با ۲۰ سی‌سی از حلال متانول با غلظت خالص به‌طور کامل عصاره‌گیری نموده، پس از ۱۵ دقیقه سانترفیوژ در دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه آن را به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و پس از صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis مدل Perkin Elmer ساخت شرکت Lambda25 با متانول خالص (به‌عنوان شاهد) جذب عصاره حاصل در طول‌موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید از رابطه‌های ۵، ۶ و ۷ بدست آمدند.

$$C_a\ (\mu g/ml) = 16.72\ A_{665.2} - 9.16\ A_{652.4} \quad (۵)$$

$$C_b\ (\mu g/ml) = 34.09\ A_{652.4} - 11.21\ A_{665.2} \quad (۶)$$

$$C_{(Car)}\ (\mu g/ml) = (1000A_{470} - 1.53\ C_a - 104.96\ C_b)/221 \quad (۷)$$

پرولین و قندهای محلول: جهت اندازه‌گیری پرولین از روش بیتس و همکارانش (Bates *et al*., 1973) استفاده شد. برای اندازه گیری پرولین، ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی تر بافت برگ توزین شد و در هاون چینی در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد، به خوبی ساییده شد. ماده همگن حاصل در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، دو میلی‌لیتر از عصاره‌های صاف شده

را به لوله‌های دربدار منتقل نموده و به همه لوله‌ها مقدار دو میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال، اضافه شد. پس از بستن درب لوله‌ها، آن‌ها به مدت یک ساعت در آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از سرد شدن، به هر یک از لوله‌ها مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. برای مخلوط کردن این دو محلول، به مدت ۲۰- ۱۵ ثانیه با استفاده از ورتکس لوله‌ها تکان داده شدند. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز در آمده و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود را برداشته و همزمان با نمونه‌های استاندارد، میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید و غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ، با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

محتوای قند کل: محتوای قند کل با روش اسید فنل اسید سولفوریک با روش دوبویس و همکاران (DuBois *et al*., 1956) با برخی تغییرات برآورد شد. ۰/۲ گرم از نمونه‌های منجمد در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر ساییده شد. سپس، محلول همگن حاصل با کاغذ صافی صاف شد. برای اندازه‌گیری قند نمونه، به ۵۰ میکرولیتر از همگن صاف شده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۸ درصد اضافه شد. بلافاصله پس از افزودن سولفوریک اسید، واکنش گرمازا همراه با تولید رنگ نارنجی ایجاد می‌شود که تولید حرارت زیادی می‌کند. بنابراین ضروری است پس از افزودن اسید، مخلوط واکنش ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شود. جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای قندهای محلول با کمک منحنی تهیه شده از گلوکز (صفر تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان استاندارد محاسبه شد.

قدرت آنتی‌اکسیدانی و نسبت Fv/Fm: پارامتر Fv/Fm (حداکثر راندمان کوانتومی فتوشیمی PSII) با تجزیه و تحلیل اولین برگ‌های کاملاً رشد یافته استویا با استفاده از فلورومتر (Hansatech، UK ،Instruments LTD) اندازه‌گیری شد. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (یا قدرت آنتی‌اکسیدان) نمونه‌های بیولوژیکی شناخته شده است. در مطالعه حاضر، از روش FRAP برای اندازه‌گیری کاهش میزان کمپلکس ferric tripyridyltriazine (Fe (III)-TPTZ) به ferrous tripyridyltriazine (Fe (II)-TPTZ) با استفاده از یک ماده کاهش دهنده در pH پایین استفاده شد. بنابراین، ظرفیت کاهش به‌عنوان شاخص قدرت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته شده است. جهت تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های برگ گیاه استویا به مدت ۳۰ دقیقه برای اندازه‌گیری در تاریکی قرار داده شدند. یک گرم از بافت برگ با هاون و با استفاده از ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد ۰/۱ مولار (۷/۶ =pH)، حاوی ۰/۱ میلی‌مولار (EDTA) ساییده شد. این مخلوط بعد از عبور از کاغذ صافی و با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدان برگ استویا توسط توانایی کاهش آهن پلاسما استفاده شد (FRAP؛ Benzie and Strain, 1996). جذب در ۵۹۳ نانومتر قرائت شد. پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره در برابر منحنی استاندارد معادل سولفات آهن محاسبه شد.

تعیین عناصر غذایی: نمونه‌های گیاه خشک شده آسیاب شده (۰/۱ گرم) و با مخلوطی HNO_3 و $HClO_4$ (با نسبت ۷:۱) هضم شدند (Zhang *et al*., 1994). غلظت روی، آهن، مس و منگنز در محلول‌های هضم شده با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Shimadzu, Japan) تعیین شد.

تجزیه آماری داده‌ها

برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم افزار آماری SAS 9.1 استفاده شد. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. داده‌ها به عنوان میانگین تکرار ± خطای استاندارد (SE) بیان شدند.

نتایج و بحث

پارامترهای رشد و کلونیزاسیون ریشه

طبق نتایج تجزیه واریانس اثرات اصلی قارچ میکوریزا *P.indica* و تنش خشکی بر صفات شاخص‌های رشد شامل وزن خشک بوته، تعداد برگ، ارتفاع بوته، قطر ساقه و کولونیزاسیون ریشه گیاه استویا در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. هم‌چنین اثر متقابل قارچ و تنش خشکی بر صفات کولونیزاسیون ریشه و قطر ساقه در سطح احتمال ۱٪ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). تلقیح با قارچ *P. indica* به‌طور قابل توجهی صفات رشدی را نسبت به گیاهان عدم تلقیح شده افزایش داد و بیشترین میزان ارتفاع بوته، تعداد برگ و وزن خشک بوته در گیاهان تلقیح شده به ترتیب با میانگین‌های ۲۹/۷۹ سانتی‌متر، ۷۱ تعداد برگ در بوته و ۰/۹۶ گرم بدست آمد. هم‌چنین صفاتی مانند ارتفاع بوته، تعداد برگ و وزن خشک با افزایش سطح خشکی در خاک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و تنش خشکی در سطوح بالاتر کم‌ترین مقادیر این صفات را شامل شد (جدول ۳). طبق یافته‌های این آزمایش گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* قطر ساقه بیشتری نسبت به گیاهان تلقیح نشده را در عدم تنش خشکی دارا بودند. بیش‌ترین و کم‌ترین قطر ساقه به‌ترتیب مربوط به تیمارهای تلقیح با قارچ میکوریزا در شرایط تنش خشکی ۲۵٪ (L1) با میانگین ۳/۲۱ میلی‌متر و عدم تلقیح با قارچ میکوریزا در شرایط تنش خشکی ۸۰٪ (L4) با میانگین ۱/۶۵ میلی‌متر بود (جدول ۲). نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی در خاک، درصد

کلونیزاسیون ریشه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و کمترین میزان کلونیزاسیون تحت خشکی ۸۰٪ از ظرفیت مزرعه (L4) در خاک مشاهده شد، به‌گونه‌ای که درصد کلونیزاسیون ریشه در گیاهان تلقیح شده از ۲۶/۹۰ به درصد ۲۰/۰۱ درصد به بود (جدول ۲).

طبق داده‌های آزمایش حاضر گیاهان تلقیح شده با *P. indica* حتی در شرایط تنش خشکی هم دارای همزیستی میکوریزایی می‌باشند. این قارچ قادر به توسعه ریشه‌ها در برابر کمبود آب در خاک است و با کاهش رطوبت خاک درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهان استویا کاهش یافت. از طرف دیگر کاهش درصد همزیستی قارچ میکوریزا می‌تواند ناشی از کاهش فتوسنتز در تنش بالا باشد و در نتیجه، کاهش عرضه کربوهیدرات توسط میزبان به قارچ، منجر به کاهش رشد قارچ و کاهش گسترش ریشه می‌شود. البته با اینکه با افزایش تنش درصد همزیستی کاهش یافت ولی با درصد پایین کلونیزاسیون اثر قابل توجهی نسبت به گیاهان عدم تلقیح دیده شد. تنش آبی تأثیر منفی بر روی برگ، ساقه و همچنین تولید مثل گیاه دارد (Eziz *et al*. 2017).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر قارچ اندوفیت *P. indica* و تنش خشکی بر برخی صفات استویا

Table 1- ANOVA for the effect of endophytic fangi (*P. indica*) and drought stress on some characteristics of stevia

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares: کلونیزاسیون ریشه Root Colonization	وزن خشک Dry weight	تعداد برگ Leaf number	ارتفاع بوته Plant height	قطر ساقه Stem diameter
قارچ اندوفیت *P. indica* (P)	1	3462.72**	0.36**	4493.33**	35.86*	1.32**
تنش خشکی Drought stress (D)	3	13.51**	0.26**	1278.38**	23.12**	0.74**
P × D	3	13.51**	0.07ns	71.16ns	11.32ns	0.15**
خطا Error	16	0.55	0.04	56.86	7.20	0.02
ضریب تغییرات CV (%)	-	5.80	22.23	13.15	9.38	5.80

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively.

ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس اثر قارچ اندوفیت *P. indica* و تنش خشکی بر برخی صفات استویا

Continued Table 1- ANOVA for the effect of endophytic fangi (*P. indica*) and drought stress on some characteristics of stevia

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares: کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کارتنوئید Carotenoids	پرولین Proline	قندهای محلول Soluble Sugars
قارچ اندوفیت *P. indica* (P)	1	6.62**	1.31**	15.50**	0.30**	439.55*	4579.89**
تنش خشکی Drought stress (D)	3	1.79**	1.49**	6.16**	0.81**	525.48**	14824.43**
P × D	3	0.13ns	0.36ns	0.46ns	0.04*	82.18ns	640.02ns
خطا Error	16	0.56	0.25	0.90	0.04	96.19	33.83
ضریب تغییرات CV (%)	-	16.19	27.80	14.82	18.97	8.44	4.96

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively.

ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس اثر قارچ اندوفیت *P. indica* و تنش خشکی بر برخی صفات استویا

Continued Table 1- ANOVA for the effect of endophytic fangi (*P. indica*) and drought stress on some characteristics of stevia

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares					
		قدرت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant power	Fv/Fm	منگنز Mn	روی Zn	آهن Fe	مس Cu
قارچ اندوفیت *P. indica* *P. indica* (P)	1	23747.89**	0.001**	14232.57**	374.06**	33973.11**	3.55**
تنش خشکی Drought stress (D)	3	18185.82**	0.011**	4451.47**	635.53**	14679.61**	14.21**
P × D	3	6817.45**	0.006^{ns}	1087.16^{ns}	416.35^{ns}	287.66^{ns}	0.35^{ns}
خطا Error	16	98.98	0.006	13.32	20.09	8.92	0.14
ضریب تغییرات CV (%)	-	8.44	10.17	3.11	7.63	1.47	12.22

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p≤0.01$ and $p≤0.05$, respectively

جدول ۲- اثر متقابل کاربرد قارچ اندوفیت *P. indica* × تنش آبی بر صفات مورد مطالعه گیاه دارویی استویا

Table 2- The interaction effect of endophytic fungi (*P. indica*) and water stress on the studied traits of stevia

قارچ اندوفیت Endophitic fungi	تنش آبی Water stress	کلونیزاسیون ریشه Root colonization (%)	قطر ساقه Stem diameter (mm)	کاروتنوئید Carotenoids ($\mu g.ml^{-1}$)	قدرت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant power (μM Fe(ll).g^{-1} FW)
-P	L1	0 ± 0 ^{e}	2.76 ± 0.03 ^{b}	1.34 ± 0.05 ^{bc}	64.5 ± 9.1 ^{c}
	L2	0 ± 0 ^{e}	2.53 ± 0.09 ^{bc}	1.13 ± 0.10 ^{cd}	76.3 ± 10.33 ^{c}
	L3	0 ± 0 ^{e}	2.44 ± 0.02 ^{c}	1.06 ± 0.06 ^{cd}	88.2 ± 10.86 ^{bc}
	L4	0 ± 0 e	1.65 ± 0.18 ^{d}	0.44 ± 0.12 ^{e}	116.53 ± 2.08 ^{b}
+P	L1	26.90 ± 0.68 ^{a}	3.21 ± 0.06 ^{a}	1.71 ± 0.10 ^{a}	81.23 ± 0.16 ^{c}
	L2	25.6 ± 0.26 ^{b}	2.79 ± 0.03 ^{b}	1.43 ± 0.14 ^{b}	117.3 ± 4.77 ^{b}
	L3	23.58 ± 1.02 ^{c}	2.7 ± 0.03 ^{bc}	0.88 ± 0.07 ^{d}	119.15 ± 3.01 ^{b}
	L4	20.01 ± 1.12 ^{d}	2.6 ± 0.03 ^{bc}	0.88 ±0.7 ^{d}	279.46 ± 15.57 ^{a}

-P: عدم تلقیح (کنترل)، P+: قارچ اندوفیت، W: تنش آبی، L: سطوح (L1: ۸۰، L2: ۶۰، L3: ۴۵و L4: ۲۵). مقادیر میانگین ± SE. در هر ستون، میانگین‌ها دارای حروت مشترک، از نظر آماری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

− P: non-inoculation (control), + P: *P. indica*, W: Water stress, L: levels (L1: 80, L2: 60, L3: 45 and L4: 25). Values are mean ± SE. In each column, the means with common letters are not statistically significant at 5% of probability level based on Duncan’s multiple range test.

جدول ۳- اثر کاربرد قارچ اندوفیت *P. indica* و تنش آبی بر صفات مورفولوژیکی و رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی استویا

Table 3- The effect of endophytic fungi (*P. indica*) and water stress treatment on the morphological and photosynthetic pigments of stevia

قارچ اندوفیت Endophytic fungi	تنش آبی Water stress	ارتفاع بوته Plant Height (cm)	تعداد برگ Leaf number (No..$plant^{-1}$)	وزن خشک Dry weight (g)	کلروفیل b Chlorophyll b ($\mu g.ml^{-1}$)	کلروفیل a Chlorophyll a ($\mu g.ml^{-1}$)	کلروفیل کل Total Chlorophyll ($\mu g.ml^{-1}$)
Main effect							
-P		27.12 ± 0.32 ^{b}	43.66 ± 4.31 ^{b}	0.81 ± 0.05 ^{b}	4.12 ± 0.16 ^{b}	1.57 ± 0.22 ^{ab}	5.7 ± 0.36 ^{b}
+P		29.79 ± 0.14 ^{a}	71 ± 4 ^{a}	0.96 ± 0.08 ^{a}	5.18 ± 0.13 ^{a}	2.05 ± 0.18 ^{a}	7.23 ± 0.28 ^{a}
	Main effect						
	L1	29.91 ± 0.78 ^{a}	67.66 ± 5.35 ^{a}	1.2 ± 0.09 ^{a}	5.09 ± 0.21 ^{a}	2.13 ± 0.16^{a}	7.22 ± 0.30 ^{a}
	L2	29.5 ± 0.31 ^{a}	63.41 ± 4.86 ^{b}	0.92 ± 0.01 ^{b}	4.83 ± 0.18 ^{b}	2.08 ± 0.15^{b}	7 ± 0.32 ^{b}
	L3	27.41 ± 0.48 ^{b}	51.25 ± 5.48 ^{c}	0.73 ± 0.03 ^{c}	4.47 ± 0.24 ^{b}	1.54 ± 0.20^{c}	6.1 ± 0.40 ^{c}
	L4	26.99 ± 0.27 ^{b}	47 ± 4.31 ^{d}	0.7 ± 0.04 ^{c}	4.21 ± 0.17 ^{b}	1.5 ± 0.17 ^{c}	5.71 ± 0.34 ^{d}

-P: عدم تلقیح (کنترل)، P+: قارچ اندوفیت، W: تنش آبی، L: سطوح (L1: ۸۰، L2: ۶۰، L3: ۴۵و L4: ۲۵). مقادیر میانگین ± SE. در هر ستون، میانگین‌ها دارای حروف مشترک، از نظر آماری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

− P: non-inoculation (control), + P: *P. indica*, W: Water stress, L: levels (L1: 80, L2: 60, L3: 45 and L4: 25). Values are mean ± SE. In each column, the means with common letters are not statistically significant at 5% of probbiltity level based on duncan’s multiple range test.

طی پژوهشی استفاده از قارچ‌های میکوریزا و کود زیستی بیوسفر موجب افزایش در صفات ارتفاع بوته، شاخص‌های رشد و عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی زیره سبز گردید و بیان کردند که احتمالاً بخشی از ریسه‌ها وارد سیستم ریشه شده و سبب کاهش غلظت اسید آبسزیک و افزایش میزان سیتوکینین‌ها شده است که این امر موجب گسترش سیستم ریشه‌ای و افزایش جذب آب و مواد غذایی می‌شود (Haghir Ebrahimabadi *et al*., 2018). همچنین طی یافته‌های زارع حسن‌آبادی و همکاران (Zare Hassanabadi *et al*., 2020) دو نوع قارچ میکوریزا *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* باعث بهبود پارامترهای رشد و افزایش درصد کلونیزاسیون ریشه پونه آبی شد و همچنین تیمار تنش خشکی بر صفات کمی و کیفی اثر گذاشت، که طی پژوهش حاضر نیز این نتایج بدست آمدند.

محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی *P. indica* و تنش خشکی بر محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود و اثر متقابل آن‌ها بر رنگدانه‌های فتوسنتزی غیر معنی‌دار شد. اثرات قارچ *P. indica* و تنش خشکی در سطح احتمال ۱٪ و اثر متقابل قارچ *P. indica* و تنش خشکی بر محتوای کاروتنوئید در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). طبق نتایج مقایسه میانگین، تلقیح با قارچ میکوریزا *P. indica* در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده میزان کلروفیل a، b و کل بافت برگ گیاه دارویی استویا افزایش یافت. میزان کلروفیل a، b و کل به ترتیب ۲/۰۵، ۵/۱۸ و ۷/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین با افزایش تنش خشکی محتوای کلروفیل a، b و کل کاهش یافت، به‌طوری که کم ترین میزان کلروفیل در تنش خشکی ۸۰٪ (L4) مشاهده شد (جدول ۳). در گیاهان تلقیح نشده و تلقیح شده با قارچ *P. indica* با افزایش سطح خشکی در خاک، میزان کاروتنوئید به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد به طوری که بالاترین سطح خشکی دارای کم‌ترین مقدار کاروتنوئید را در برگ‌های استویا بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان کاروتنوئیدها به ترتیب با میانگین‌های ۱/۷۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت ۲۵٪ (L1) با تلقیح قارچ و ۰/۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت ۸۰٪ (L4) با عدم تلقیح قارچ مشاهده شد (جدول ۲). گزارش شده است که قارچ میکوریزا *P. indica* می‌تواند با افزایش سرعت رشد از طریق مسیرهای تکامل بیوشیمیایی برای تولید هورمون‌های رشدی مانند اکسین و سیتوکینین‌ها و یا تقویت جذب عناصر غذایی توسط گیاهان میزبان، سازگاری و توانایی رقابت میزبان را افزایش دهد (Sirrenberg *et al*., 2007). افزایش رشد ناشی از *P. indica* را می‌توان به افزایش فلورسانس و بالا بردن محتوای کلروفیل a و b و در راندمان فتوسنتز میزبان نسبت داد. افزایش غلظت پرولین و قدرت آنتی‌اکسیدانی درگیر در مکانیسم‌های واسطه قارچ‌های میکوریزایی در تقویت و مقاومت گیاه در برابر تنش آب، منجر به تقویت رشد گیاه پونه می‌شود (Zare Hassanabadi *et al*., 2020).

جدول ٤– اثر کاربرد قارچ اندوفیت *P. indica* و تنش آبی بر صفات مورد مطالعه گیاه دارویی استویا

Table 4- The effect of endophytic fangi (*P. indica*) and water stress treatment on the studied traits of stevia

قارچ اندوفیت Endophytic fangi	تنش آبی Water stress	فلورسانس Fv/Fm	قندهای محلول Soluble Sugars (mg.g^{-1} FW)	پرولین Proline (µmol.g^{-1} FW)
Main effect				
-P		0.76 ± 0.010 ab	86.61 ± 9.81 b	119.65 ± 6.26 b
+P		0.77 ± 0.013 a	147.5 ± 8.99 a	134.80 ± 3.41 a
	Main effect			
	L1	0.82 ± 0.007 a	80.48 ± 11.07 c	122.454 ± 10.92c
	L2	0.77 ± 0.005 b	95.43 ± 20.30 c	123.37 ± 7.50c
	L3	0.75 ± 0.010 c	125.93 ± 16.25 b	126 ± 7b
	L4	0.71 ± 0.003 d	166.38 ± 21.17 a	137.09 ± 4.61a

P-: عدم تلقیح (کنترل)، P+: قارچ اندوفیت، W: تنش آبی، L: سطوح (L1: ۸۰، L2: ۶۰، L3: ۴۵و L4: ۲۵). مقادیر میانگین ± SE. در هر ستون، میانگین‌ها دارای حروت مشترک، از نظر آماری با استفاده از آزمون چندامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

− P: non-inoculation (control), + P: *P. indica*, W: Water stress, L: levels (L1: 80, L2: 60, L3: 45 and L4: 25). Values are mean ± SE. In each column, the means with common letters are not statistically significant at 5% of brobability level based on Duncan's multiple range test.

محتوای فلورسانس، قندهای محلول و پرولین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های این آزمایش نشان داد که اثرات اصلی تلقیح قارچ و تنش خشکی بر Fv/Fm در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). افزایش تنش خشکی باعث کاهش مقادیر Fv/Fm گردید به گونه‌ای که بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار فلورسانس به ترتیب مربوط به سطوح تنش خشکی ۲۵٪ (L1) با میانگین ۰/۸۲ و تنش خشکی ۸۰٪ (L4) با میانگین ۰/۷۱ بود. تلقیح با قارچ *P. indica* باعث افزایش Fv/Fm گردید، به‌طوری که

مقادیر Fv/Fm از گیاهان تلقیح شده با قارچ اندوفیت بیشتر از گیاهان در شرایط عدم تلقیح با قارچ بود (جدول ۴). طبق نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های آزمایش حاضر، اثرات اصلی قارچ میکوریزا و تنش خشکی بر محتوای قندهای محلول در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود، اثر متقابل فاکتورهای قارچ *P. indica* و تنش خشکی بر میزان قندهای محلول معنی‌دار نشد (جدول ۱). با افزایش رطوبت در خاک، مقدار قند محلول کل افزایش یافت و بیش‌ترین میزان قندهای محلول با میانگین ۱۶۶/۳۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت برگ استویا مشاهده شد. از طرف دیگر، افزایش در میزان قندهای محلول در گیاه استویا تلقیح شده با قارچ در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده مشاهده شد (جدول ۴). اثر اصلی *P. indica* در سطح احتمال ۵٪ و تنش خشکی در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای پرولین معنی‌دار بود. هم‌چنین اثر متقابل قارچ میکوریزا × تنش خشکی بر صفات محتوای پرولین غیر معنی‌دار شد (جدول ۱). طبق نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی قارچ و تنش خشکی، تلقیح گیاه استویا با قارچ *P. indica* بر میزان پرولین ۱۲/۶ درصد بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود. مقدار پرولین بافت برگ گیاه استویا با افزایش تنش خشکی افزایش یافت، به نحوی که بیش ترین میزان پرولین در تنش خشکی ۸۰٪ (L4) با میانگین ۱۳۷/۰۹ میکرومول بر گرم وزن تر برگ بدست آمد (جدول ۴).

پرولین در طیف گسترده‌ای از گیاهان به خصوص در شرایط تنش تولید می‌شود. در گیاهان تلقیح شده با *P. indica* در شرایط تنش مقدار پرولین بیشتری تولید می‌شود و گیاه را قادر می‌سازد که در جریان تنش، پتانسیل آب برگ بالاتر را حفظ کرده و در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کنند (Lee *et al*., 2001). یافته‌های مشابه نیز در گیاه آربیدوبسیس گزارش شده است (Sherameti *et al*., 2008). طی پژوهشی در گیاه کلم چینی (*Chinese cabbage*) مشاهده شد که مقدار Fv/Fm در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* تحت تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش نیافت (Sun *et al*., 2010). احتمالاً قارچ با افزایش توانایی سیستم فتوسنتزی گیاه، تسهیل انتقال الکترونی و افزایش تراکم واحدهای فتوسنتزی، سیستم فتوسنتز را تحریک کند. بنابراین اثر مثبت و متقابل گیاه با قارچ میکوریزا ریشه بر عملکرد فتوسنتزی گیاهان منجر می‌شود. افزایش قند محلول در گیاهان تحت تیمار با قارچ میکوریزا توسط بهویان و همکاران (Bhuyan *et al*., 2015) گزارش شده است. آن‌ها گزارش دادند که همزمان تلقیح *P. indica* و *Azotobacter chroococcum* باعث افزایش جذب کربن و نیتروژن توسط قارچ‌ها می‌شود. می‌توان پیش بینی کرد که تلقیح گیاهان با *P. indica* و *A. chroococcum* مواد مغذی مهمی را برای گیاهان فراهم می‌کند که سنتز فتوسنتز را افزایش می‌دهد و در نتیجه باعث افزایش کلروفیل، کاروتنوئیدها، کل قند و پروتئین می‌شود که باعث رشد بیشتر گیاه می‌گردد. علاوه بر این، افزایش غلظت قندهای محلول مانند گلوکز، ساکارز و فروکتوز تحمل گیاه را در برابر چندین تنش غیر طبیعی مانند خشکی، شوری و سرما تقویت می‌کند (Rathinasabapathi, 2000).

گلوکز باعث بسته شدن روزنه و تقویت سازگاری گیاه در شرایط تنش خشکی می‌شود. تجمع شکر از اکسیداسیون غشای سلولی در معرض تنش خشکی جلوگیری می‌کند (Arabzadeh, 2012). قند محلول همچنین باعث حفظ محتوای آب برگ و تنظیم اسمزی گیاهان تحت شرایط تنش خشکی می‌شود (Xu *et al*., 2010). آزمایش ما به وضوح نشان می‌دهد که تنش خشکی از نظر غلظت قند محلول در برگ، تحت تنش خشکی (خصوصاً در بالاترین سطح) از نظر گیاهان سودمند است. دلیل تأثیر قارچ در افزایش محتوای قندهای محلول افزایش سطوح هورمون‌های گیاهی مانند سایتوکنین و جیبرلین در گیاهان میکوریزایی می‌باشد. افزایش در میزان این هورمون‌های به‌ویژه سایتوکنین می‌تواند با انتقال یون‌های مؤثر در باز شدن روزنه‌ها و تنظیم سطح کلروفیل، موجب افزایش و بالا رفتن سرعت فتوسنتز و در نهایت افزایش محتوای کربوهیدرات‌ها در گیاهان شود (Zare Hassanabadi *et al*., 2020). کاربرد کودهای زیستی با منشأ قارچ‌های میکوریزایی باعث افزایش در قندهای محلول و محتوای آنتوسیانین گیاه استویا شد (Valinezhad *et al*., 2019). در پژوهشی قارچ *P. indica* توانست در شرایط رطوبتی یکسان، شاخص و فلورسانس کلروفیل را در گیاه آنیسون تلقیح شده نسبت به شاهد بدون قارچ افزایش دهد. هم‌چنین افزایش ۱۲/۸۲ درصدی نسبت Fv/Fm در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica*، می‌تواند نشانه افزایش میزان حفاظت نوری باشد و هم‌چنین دلیلی است بر اینکه قارچ بر کارایی فتوسنتز اثر معنی‌داری گذاشته است (Abdollahi *et al*., 2019).

محتوای قدرت آنتی‌اکسیدانی

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات اصلی قارچ *P. indica*، تنش خشکی و اثر متقابل آن‌ها بر محتوای قدرت آنتی اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در گیاهان تلقیح نشده و تلقیح شده با *P. indica*، با افزایش سطح خشکی در خاک، میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی به‌طرز چشم‌گیری افزایش یافت، به‌طوری که بالاترین سطح تنش خشکی در خاک بیش‌ترین مقدار قدرت آنتی‌اکسیدان را در برگ‌های استویا تولید کرد. افزایش برای محتویات قدرت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب ۷۳/۵۳ درصد و ۱۳/۸۱ درصد در ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت مزرعه بدست آمد (جدول ۲). طبق مطالعه حاضر ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدان کل برگ گیاه استویا تحت تیمار با *P. indica* در اتلاف الکترون‌های تولید شده فتوسنتزی و در کاهش آسیب اکسیداتیو تنش آبی کمک می‌کند (Valinezhad *et al*., 2019).

ریزمغذی‌ها

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های تحقیق حاضر، اثر اصلی قارچ میکوریزا (*P. indica*) و تنش خشکی بر مقدار مس، آهن، روی و منگنز در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل قارچ میکوریزا (*P. indica*) در تنش خشکی بر صفات عناصر ریزمغذی غیر معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین اثر قارچ میکوریزا (*P. indica*) بر عناصر ریزمغذی‌ها نشان داد که افزایش در میزان غلظت عناصر مس (۳/۵۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک)، آهن (۲۴۰/۳۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک)، روی (۶۱/۸۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و منگنز (۱۴۱/۴۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد. با افزایش سطح تنش خشکی در خاک، غلظت مس و آهن به‌طور معنی‌داری در برگ‌های استویا کاهش یافت و بیش‌ترین میزان عناصر مس، آهن، روی و منگنز به ترتیب با میانگین‌های ۴/۴۳، ۲۵۲/۸۴، ۶۵ و ۱۳۴/۱۲ میکروگرم بر گرم وزن خشک برگ در تنش ۲۵٪ (L1) بدست آمد (جدول ۵).

با توجه به تحرک کم روی، آهن، مس و منگنز در خاک، جذب این مواد مغذی فلزی از طریق ریشه از طریق انتشار محدود است. هرچه تجمع هیف‌های قارچی در ریشه بیشتر باشد، سطح جذب آن نیز بیشتر است، گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا به‌طور مؤثرتر باعث جذب این مواد مغذی فلزی با تحرک کم می‌شوند. نقش مثبت تلقیح قارچ میکوریزا بر جذب ریز مغذی‌ها برای چند گونه گیاه توسط محققان متعددی مورد توجه قرار گرفته است (Ortas *et al.*, 2011). تلقیح میکوریزایی باعث افزایش محتوای منگنز در مقایسه با گیاهان غیر تلقیح در گیاه کاهو گردید (Sanmartín *et al.*, 2014). گوسال و همکاران (Gosal *et al.*, 2010) گزارش دادند که استفاده از تلقیح *P. indica* در *Chlorophytum SP*، جذب ریز مغذی (مس و منگنز) بسیار بهبود یافته است. با افزایش تنش خشکی در خاک، جذب عناصر ریز مغذی (مس، آهن، منگنز و روی) توسط گیاه کاهش یافت. انتقال مواد مغذی از خاک به ریشه هنگام در دسترس نبودن آب باعث کاهش جذب مواد مغذی از خاک می‌شود که از مکانیسم های تخلیه و کاهش جریان تعرق ناشی می‌شود (Baligar *et al.*, 2001).

جدول ۵- اثر کاربرد قارچ اندوفیت *P. indica* و تنش خشکی بر محتوای عناصر غذایی در برگ گیاه استویا

Table 5- The effect of endophytic fangi (*P. indica*) and drought stress on nutrient contents of the Stevia leaf

قارچ اندوفیت Endophytic fangi	تنش آبی Water stress	مس Cu (µg/g DW)	آهن Fe (µg/g DW)	روی Zn (µg/g DW)	منگنز Mn (µg/g DW)
Main effect					
-P		2.77 ± 0.36 b	165.11 ± 15.26 b	47.57 ± 3.08 b	92.68 ± 0.55 b
+P		3.54 ± 0.31 a	240.37 ± 30.46 a	61.80 ± 2.93 a	141.48 ± 0.24 a
	Main effect				
	L1	4.43 ± 0.32 a	252.84 ± 28.55 a	65.00 ± 4.32 a	134.12 ± 0.81 a
	L2	3.52 ± 0.42 b	234.31 ± 37.77 b	59.82 ± 4.40 a	147.45 ± 0.39 a
	L3	2.80 ± 0.41 c	177.66 ± 50.95 c	50.50 ± 3.07 b	106.45 ± 0.86 ab
	L4	1.87 ± 0.14 d	146.14 ± 47.94 d	43.43 ± 4.13 b	80.3 ± 0.41 b

P-: عدم تلقیح (کنترل)، P+: قارچ اندوفیت، W: تنش آبی، L: سطوح (L1: ۸۰، L2: ۶۰، L3: ۴۵و L4: ۲۵). مقادیر میانگین ± SE. در هر ستون، میانگین‌ها دارای حروف مشترک، از نظر آماری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

− P: non-inoculation (control), + P: *P. indica*, W: Water stress, L: levels (L1: 80, L2: 60, L3: 45 and L4: 25). Values are mean ± SE. In each column, the means with common letters are not statistically significant at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test.

نتیجه‌گیری

این مطالعه تأثیر مثبت تلقیح قارچ اندوفیت *P. indica* بر ویژگی‌های کمی و کیفی مانند کولونیزاسیون ریشه، وزن خشک، تعداد برگ، ارتفاع بوته، قطر ساقه، کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پرولین، قندهای محلول، قدرت آنتی‌اکسیدانت و عناصر ریزمغذی مس، آهن، روی و منگنز گیاه دارویی استویا را نشان داد، و تنش خشکی موجب کاهش صفات مورد بررسی بجز محتوای پرولین، قندهای محلول و قدرت آنتی‌اکسیدان شد. تلقیح نشاهای استویا با قارچ اندوفیت *P. indica* در سطوح تنش خشکی نسبت به عدم تلقیح قارچ دارای بیش‌ترین میزان کولونیزاسیون ریشه، قطر ساقه، محتوای کاروتنوئیدی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بودند. بنابراین با توجه به اثر ترکیبات زیستی با منشأ طبیعی و تولید گیاهان با ترکیبات ثانویه فعال سالم‌تر، کاربرد قارچ اندوفیت *P. indica* توصیه می‌شود.

منابع

1. Abdollahi, S., Ali Asgharzad, N., Zahtab Selmasi, S., & Khoshru, B. (2019). Effects of endophytic fungus piriformospora indica on growth indices and nutrient uptake by anise plant (*Pimpinella anisum*) under water deficit

stress conditions. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *29*(4), 51-64.
2. Arabzadeh, N. (2012). The effect of drought stress on soluble carbohydrates (sugars) in two species of *Haloxylon persicum* and *Haloxylon aphyllum*. *Asian Journal of Plant Sciences*, *11*, 44-51. https://doi.org/10.3923/ajps.2012.44.51
3. Baligar, V.C., Fageria, N.K., & He, Z.L. (2001). Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *32*, 921-950.
4. Bates, L.S., Waldern, R.P., & Teave, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060
5. Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*, 70–76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292
6. Bhuyan, S.K., Bandyopadhyay, P., Kumar, P., Mishra, D.K., Prasad, R., Kumari, A., & Yadava, P.K. (2015). Interaction of *Piriformospora indica* with Azotobacter chroococcum. *Scientific Reports*, *5*, 13911. https://doi.org/10.1038/srep13911
7. Brodersen, C.R., Roddy, A.B., Wason, J.W., & McElrone, A.J. (2019). Functional status of xylem through time. *Annual Review Plant Biology*, *70*, 407–433. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100455
8. Cheng, H.Q., Zou, Y.N., Wu, Q.S., & Kuča, K. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate drought stress in trifoliate orange by regulating H+-ATPase activity and gene expression. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 659-694. https://doi.org/10.1016/10.3389/fpls.2021.659694
9. Costache, M.A., Campeanu, G., & Neata, G. (2012). Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. *Romanian Biotechnological Letters*, *17*(5), 7702-7708.
10. Devincentis, A.J. (2020). *Scales of sustainable agricultural water management*. Ph.D. Thesis, University of California, Davis, CA, USA.
11. Diatta, A.A., Fike, J.H., Battaglia, M.L., Galbraith, J., & Baig, M.B. (2020). Effects of biochar on soil fertility and crop productivity in arid regions: A review. *Arabian Journal of Geosciences*, *13*, 595. https://doi.org/10.1007/s12517-020-05586-2
12. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *American Chemical Society*, *28*(3), 350–356
13. Eziz, A, Yan, Z, Tian, D, Han, W, Tang, Z., & Fang, J. (2017). Drought effect on plant biomass allocation: A meta-analysis. *Ecology and Evolution*, *7*, 11002–11010. https://doi.org/10.1002/ece3.3630
14. Gao, A.X., & He, X.L. (2007). Ecological study on am fungi around roots of medicinal plants in the middle area of Hebei province. *Agricultural Research in the Arid Areas*, *25*(3), 196-202. https://doi.org/10.1016/S1872-2040(07)60079-6
15. Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular *Arbuscular Mycorrhizal* infection in roots. *New Philologists*, *84*, 489-500. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
16. Gosal, S.S., Wani, S.H., & Kang, M.S. (2010). Biotechnology and crop improvement. *Journal of Crop Improvement*, *24*(2), 153-217. https://doi.org/10.1080/15427520903584555
17. Haghir Ebrahimabadi, A., Hatami, M., Karimzadeh Asl, K., & Ghorbanpour, M. (2018). Effect of mycorrhizal fungi and biophosphor fertilizer on growth features, yield and yield components, and essntial oil constituents in *Cuminum cyminum* L. *Journal of Medicinal Plants*, *17*(66), 74-90. (In Persian with English abstract). https://doi.org/20.1001.1.2717204.2018.17.66.3.1
18. Hajihashemi, S., & Ehsanpour, A.A. (2014). Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* B. to polyethylene glycol and paclobutrazol treatments under in vitro culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(8), 4038-4052. (In Persian with English abstract)
19. Hamzei, J., & Salimi, F. (2015). Root colonization, yield and yield components of milk thistle (*Silybum marianum*) affected by mycorhizal fungi and phosphorus fertilizer. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *24*(4), 85-96.
20. Hill, T.W., & Kafer, E. (2001). Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports*, *48*, 8. https://doi.org/10.4148/1941-4765.1173
21. Lee, D.H., Kim, Y.S., & Lee, C.B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Jurnal Plant Physioloy*, *158*, 737–745. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00174
22. Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, Nutritional and Functional Aspects. *Food Chemistry*, *132*(3), 1121-1132. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140
23. Ma, Y.F., Yang, X.H., Li, P.M., & Tong, R.J. (2005). Investigation of the diversity of arbuscular mycorrhizal structure of medicinal plants in Chongqing. *Journal of Southwest Agricultural University*, *27*(3), 406-409.
24. Meng, L.L., He, J.D., Zou, Y.N., Wu, Q.S., & Kuča, K. (2020). Mycorrhiza-released glomalin-related soil protein fractions contribute to soil total nitrogen in trifoliate orange. *Plant, Soil and Environment*, *66*, 183-189. https://doi.org/10.17221/100/2020-PSE
25. OConnell, E. (2017). Towards adaptation of water resource systems to climatic and socio-economic Chang. *Water*

Resources Management, *31*, 2965–2984. https://doi.org/10.1007/s11269-017-1734-2
26. Okorie, V.O., Mphambukeli, T.N., & Amusan, S.O. (2019). Exploring the political economy of water and food security nexus in BRICS. *Africa Insight*, *48*, 21–38. https://hdl.handle.net/10520/EJC-15b208a68b
27. Ortas, I., Sari, N., Akpinar, C., & Yetisir, H. (2011). Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae*, *128*, 92–98. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.014
28. Phillips, J.M., & Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, *55*(1), 158-161. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3
29. Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, *86*, 709-716. https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1254
30. Sanayei, S., Barmaki, M., Ebadi khazine Gadim, A., & Torabi Giglou, M. (2021). Effect of drought stress and inoculation of mycorrihizal fungi and *Pseudomonas* spp. on some morpho-physiological characteristics of roselle (*Hibiscus sabdaeiffa* L.). *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *30*(2), 71-89.
31. Sanmartín, C., Garmendia, I., Romano, B., Díaz, M., Palop, J.A., & Goicoechea, N. (2014). Mycorrhizal inoculation affected growth, mineral composition, proteins and sugars in lettuces biofortified with organic or inorganic selenocompounds. *Scientia Horticulturae*, *180*, 40–51. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.049
32. Seyedmohammadi, N., Barmaki, M., & Davari, M. (2019). Effect of mycorrhizal fungi on leaf yield, root colonization percentage and some features of *Stevia rebaudiana* root in a soilless culture system. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *29*(2), 189-204.
33. Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., & Oelmüller, R. (2008). The root-colonizing endophyte *Pirifomospora indica* confers drought tolerance in Arabidopsis by stimulating the expression of drought stress–related genes in leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(6), 799-807. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0799
34. Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.H., & Varma, A. (2000). Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica* – A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science*, *79*(11), 1548-1554.
35. Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Petr Karlovsky, P., Patricia Santos, P., Feussner, L., & Pawlowski, K. (2007). Piriformospora indica affects plant growth by auxin production. *Physiology Plantarum*, *131*, 581-589. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00983.x
36. Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R., & Lou, B. (2010). *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology*, *167*(12), 1009-1017. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.02.013
37. Tebuqin Bao, Y.Y. (2015). Colonization characteristics of AMF in common mongolian medicinal plants of horqin sandy land. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, *43*(6), 25-28. https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-0907.2015.06.008
38. Ucar, E., Ozyigit, Y., & Turgut, K. (2016). The effects of light and temperature on germination of stevia (*Stevia rebaudiana* BERT.) seeds. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, *3*(1), 37-40.
39. Valinezhad, Z., Gholizadeh, A., Naeemi, M., Gholamalalipour Alamdari, E., & Zarei, M. (2019). Effects of vermicompost and mycorrhizal fungus on quantitative and qualitative traits of medicinal plant *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *35*(3), 484-500. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2019.123788.2417
40. Varma, A., Sheramati, I., & Tripathi, S. (2012). *The symbiotic fungus Piriformospora indica*. Review. In Hock B (eds). Fungal Associations. 2nd Ed. Berlin: Springer; pp. 231-154.
41. Wu, Q.S., Gao, W.Q., Srivastava, A.K., Zhang, F., & Zou, Y.N. (2020). Nutrient acquisition and fruit quality of Ponkan mandarin in response to AMF inoculation. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *90*, 1563-1567.
42. Xu, F., Tan, X., & Wang, Z. (2010). Effects of sucrose on germination and seedling development of *Brassica Napus*. *International Journal of Biology*, *2*, 150-154.
43. Zare Hassanabadi, M Z., Dashti, M., & Akhondi, M. (2020). The effect of two species of *Arbuscular mycorrhiza* fungi on the activity of antioxidant enzymes and morphophysiological characteristics of *Mentha pulegium* L. in drought stress. *Technology of Medicinal and Aromatic Plants of Iran*, *2*(2), 83-99. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/MPT.2020.127803.1049
44. Zhang, H., Sun, J.Q., & Bao, Y.Y. (2015). Advances in studies on plant secondary metabolites influenced by *Arbuscular mycorrhizal* fungi. *Journal of Agricultural Biotechnology*, *23*(8), 1093-1103. https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-7968.2015.08.013
45. Zhang, Y., Proenca, R., & Maffei, M. (1994). Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature*, *372*, 425–432.
46. Zhang, Z., Zhang, J., & Huang, Y. (2014). Effects of *Arbuscular mycorrhizal* fungi on the drought tolerance of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings under greenhouse conditions. *New For*, *45*, 545–556.